

## セロトニンの嗅覚機能への影響

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 侃教授)

塚 谷 才 明

嗅球におけるセロトニン (serotonin) の働きを調べるため、ラットで嗅球に投射するセロトニン線維を神経毒を用いて選択的に障害し嗅覚に与える影響を実験行動学的、神経組織学的に検討した。あらかじめ右側嗅球を除去し、ナラマイシンによる嗅覚条件づけ学習を行い正解率が 100% になった後、左側の内側前脳束にセロトニン神経毒である 5,7-ジハイドロキシトリプタミン (5,7-dihydroxytryptamine, 5,7-DHT) を注入した。注入後 3 日, 7 日, 14 日, 21 日, 28 日にナラマイシンによる嗅覚行動実験をした後灌流固定し、嗅球はセロトニン, ドーパミンベータハイドロキシラーゼ (dopamine  $\beta$ -hydroxylase), タイロシンハイドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase) に対する抗体を, 嗅上皮はプロテインジーンプロダクト 9.5 (protein gene product 9.5, PGP9.5) に対する抗体を用いて免疫染色し観察した。5,7-DHT 注入群は嗅球のセロトニン線維の障害の程度によりセロトニン線維の糸球体優位の分布が消失していた完全障害群と糸球体優位の分布が残っていた不完全障害群に分類した。その結果, 完全障害群は行動実験にて 5,7-DHT 注入後 21~28 日には無嗅覚の状態となることがわかった。組織学的検索では嗅球の大きさは縮小し, 嗅神経線維層の消失と糸球体層, 顆粒細胞層の萎縮が認められた。嗅上皮は著明に萎縮し, PGP9.5 陽性の嗅細胞は減少または完全に消失していた。不完全障害群では明らかな行動学的, 形態的異常を認めなかった。以上の結果から, 嗅球での著明なセロトニンの低下は著しい嗅覚機能低下をきたすことが明らかになった。嗅覚障害の 1 つの新しいメカニズムを提起できるものと思われる。

**Key words** serotonin, 5,7-dihydroxytryptamine, olfactory disturbance, olfactory bulb, olfactory epithelium

セロトニン (serotonin) は, 1953 年 Twarog らによって中枢神経組織の中に広く分布していることが始めて生化学的に証明されたモノアミン系の神経伝達物質であり<sup>1)</sup>, 睡眠, 体温調節, 血圧調節, 情動, 行動などへの関与が示唆されている<sup>2)</sup>。免疫組織化学法の発達に伴ってセロトニンニューロンの細胞体と線維の分布が形態学的に調べられ, 細胞体は脳幹にのみ限局しているが, その線維は大腦皮質から脊髄に至るまで中枢神経系全域に膨大な分枝をのびしていることが明らかになった。限局した部の細胞体より中枢神経系全体に広く線維を投射するという形態的特徴から, セロトニンニューロン系は全体調節系としてニューロンの伝達機構を修飾し, 様々な形で活動レベルを調節するのに役だっているものと推定されている。セロトニン線維の分布は領域によって明瞭な動物種差を示すが<sup>3)~5)</sup> ラット嗅球には脳幹の背側縫線核, 正中縫線核よりでた線維が内側前脳束を通り, 嗅球の糸球体層に叢をなして豊富に投射する<sup>6)~9)</sup>。糸球体層は末梢感覚受容細胞 (嗅細胞) と嗅球の出力ニューロン群 (僧帽細胞と房飾細胞) との間のシナプス形成の部位であることから, セロトニンは一次感覚ニューロンから二次感覚ニューロンへの情報伝達に関与しているものと推定される<sup>10)</sup>。実際にセロトニンはこの情報伝達に抑制を及ぼす事が電気生理学的に報告されている<sup>11)12)</sup>。しかし, セロトニンが嗅覚機能にどのように関与しているかは不明である。

そこで今回著者は, ラットを用いて嗅球に投射するセロトニン線維を選択的に障害し, それにより嗅覚にどのような影響がでるかを防鼠剤シクロヘキシミドを用いた嗅覚行動実験にて検討した。その結果, 嗅球での著明なセロトニン低下は著しい嗅覚機能低下をきたすことが明らかになった。このセロトニン神経毒によって誘発される実験的嗅覚障害について行動学的並びに形態学的に詳細に検討したので報告する。

## 対象および方法

体重 200g~400g の成熟雄 Sprague-Dawley 系ラットを使用し, 表 1 に示した手順に従い実験を行った。なおラットはシクロヘキシミド (ナラマイシン<sup>R</sup>, 以下ナラマイシンと記述する) (田辺, 大阪) には未経験のものである。

## 1. 右側嗅球除去

個々の実験動物について, 嗅覚機能, 嗅球セロトニン量, 嗅上皮と嗅球の形態的变化の 3 者を正確に対応させるために, 全例のラットであらかじめ右側の嗅球を除去し左側一側のみで検討をおこなった。

ペントバルビタール (50mg/kg, ネンブタール<sup>R</sup>, ダイナボット, 大阪) の腹腔内投与による麻酔下に頭部正中に皮膚切開をいれ, 右側の前頭骨の最前方をマイクロドリルにて削開除去し, 右側嗅球を露出させた。その後右側嗅球上の硬膜にメスで

平成 5 年 12 月 16 日受付, 平成 6 年 1 月 20 日受理

Abbreviations: Cx, cerebral cortex; DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase; 5,6-DHT, 5,6-dihydroxytryptamine; 5,7-DHT, 5,7-dihydroxytryptamine; EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; GL, glomerular layer; MCL, mitral cell layer; MFB, medial forebrain bundle; MRN, midbrain raphe nuclei; OB, olfactory

切開をいれた後、嘴管にて右側嗅球のみを吸引除去した。止血は線維性コラーゲン塩酸塩（アビテン<sup>®</sup>）（ゼリア，東京）にておこなった。止血確認後、頭皮を絹糸にて縫合した。

## II. 嗅覚行動実験

### 1. ナラマイシン

ナラマイシンは特有の臭いと味を持つ。ラットにとってナラマイシンの臭いは特に忌避をおこすものではないが、ナラマイシンの味は不快でナラマイシンを口にすると唾を出し口を床面にこすりつけもがく。ラットは度々ナラマイシンの味を経験すると、その臭いを記憶し、その後はナラマイシンの臭いをかいただけでナラマイシンを忌避するようになる<sup>[13]~[16]</sup>。

### 2. ナラマイシンによる条件づけ学習

右側嗅球除去後、すべてのラットにナラマイシンによる条件づけ学習をおこなった。

飼料は任意に与えたが、ラットを喝の状態にするため72時間断水とした。その後ラット飼育ケージにラットを1匹入れ、水道水の入った給水瓶と0.01% ナラマイシン水溶液の入った給水瓶を同時に与えた。水道水の入った給水瓶をなめた場合を“正解”とし、ナラマイシンの入った給水瓶をなめた場合を“誤り”とした。試行中も喝の状態を維持するため、給水瓶の先端に口をつけるとすぐに給水瓶をとりはずして、ラットは1回に少量しか飲水できないようにした。1回給水瓶に口をつける度に両方の給水瓶をとりはずし、Gellermann 系列に従って規則性のないようにそれぞれの給水瓶の位置を替えた。10回の試行を1クールとし、“正解”回数を試行回数（10回）で除したものを正解率とした。ナラマイシンの学習を完全なものとするため数クールを行い、どのラットも3~4クールで最終的な正解率が100%となった。

## III. 嗅球におけるセロトニン線維障害動物の作成（図1）<sup>[17]</sup>

### 1. 5,7-ジハイドロキシトリプタミン（5,7-dihydroxytryptamine, 5,7-DHT）注入群

5,7-DHT（Sigma, St Louis, USA）はセロトニンニューロンの神経毒でセロトニンニューロンに選択的に取り込まれ細胞障害

性の複合物となりニューロンの退行・変性をおこす事が知られている<sup>[18]</sup>。この5,7-DHTを脳幹の縫線核にある細胞体から嗅球へセロトニン線維が投射する途中の経路である内側前脳束へ注入し、左側の嗅球におけるセロトニン線維を障害した<sup>[19]</sup>。

右側嗅球除去後、ナラマイシンによる学習で正解率が100%となったラット20匹を使用した。

ペントバルビタール全身麻酔下にラット頭部をステレオ手術台に固定し、左側の内側前脳束にあたる前頭骨（ブレグマより2mm前方）と頭頂骨（ブレグマより2mm後方）にマイクロドリルで小孔をあけた。この孔より左側の内側前脳束の吻側と尾側の2ヶ所に4μlずつ5,7-DHT（4~8μg/4μl生理食塩水、アスコルビン酸1μg/μl加）を注入した。注入はHamiltonマイクロシリンジ（10μl用）を用いて1μl/minの速度で注入し、周囲への漏洩や組織の機械的損傷を極力少なくするようにつとめた。

### 2. 対照群

右側嗅球除去後、ナラマイシンによる学習で正解率が100%となったラット10匹を使用した。

上記と同様に、左側の内側前脳束の吻側と尾側の2ヶ所に4μlずつ生理食塩水（アスコルビン酸1μg/μl加）を注入した。

## IV. 処置後の嗅覚行動実験

5,7-DHT注入群、対照群ともに処置後3日、7日、14日、21日、28日に前述した方法で1クール（10回試行）ずつ嗅覚行動実験をおこない、正解率をもとめた。

各群の各観察日における各ラットの正解率の和をラット数で除したものを平均正解率とした。理論的には嗅覚が正常なラット群の平均正解率は100%に近づき、無嗅覚の状態のラット群の平均正解率は50%に近づくことになる。ナラマイシンによる嗅覚行動実験で嗅覚機能を検定することの妥当性を確かめるために、次のような予備実験をおこなった。今回の実験と同一条件で右側嗅球を除去後、ナラマイシンによる学習で正解率が100%になったラット3匹について、さらに左側嗅球除去をおこなった。両側嗅球除去処置をうけたこれらのラットについて正解率を求めた結果、処置後3日から28日までの観察期間を通じて平均正解率は50%であった。このことからナラマイシン

Table 1. Experimental procedures

- (1) Rats were subjected to removal of unilateral olfactory bulb.
- (2) Bulbectomized rats were trained to avoid 0.01% cycloheximide (Naramycin) solution.
- (3) Conditioned rats received two injections of 5, 7-dihydroxytryptamine (5, 7-DHT, 4 or 8 μg in 4 μl) or vehicle (4 μl of isotonic saline containing 0.1% ascorbic acid) into the rostral (A: 2.0, L: 1.5, D: -8.0 mm) and caudal (A: -2.0, L: 2.0, D: -8.5 mm) parts of the medial forebrain bundle contralaterally to bulbectomy.
- (4) Olfactory function was examined by the ability to discriminate 0.01% cycloheximide solution from water 3, 7, 14, 21, and 28 days after injections of 5, 7-DHT or vehicle.
- (5) After completing the behavior task, all rats were perfused with a fixative, and specimens including olfactory epitheliums, olfactory bulbs and other brain areas were taken for morphological analyses. The evaluation of the degree of serotonin depletion in each olfactory bulb was done immunohistochemically.

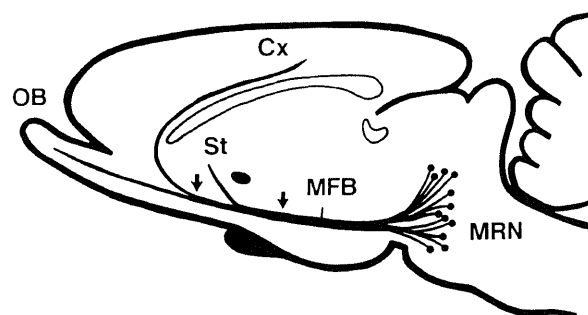


Fig. 1. Simplified schematic diagram showing ascending serotonergic pathways in rat brain. Olfactory bulb (OB) receives massive serotonergic inputs through medial forebrain bundle (MFB). Arrows indicate injection sites of 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) or vehicle. Cx, cerebral cortex; MRN, midbrain raphe nuclei; St, striatum.

bulb; ONL, olfactory nerve layer; 0.3% PBST, phosphate-buffered saline with 0.3% Triton-X100; PGP9.5, protein gene product 9.5; St, striatum; -TH, tyrosine hydroxylase.

による行動実験は嗅覚機能を調べる上で十分に信頼性があるものと考えられた。統計的に各群の間の差を調べるため、各群の平均正解率の間で一元配置分散分析の後、Schefféの多重比較法を行い、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

## V. 組織学的観察

### 1. 固定

28日目の行動実験を終了した後、すべてのラットをペントバルビタール深麻酔下に開胸し経心的に灌流固定した。灌流液は4% パラホルムアルデヒド、0.1% グルタルアルデヒド、0.2% ピクリン酸を含む0.1M 磷酸緩衝液を用いた。灌流固定後、鼻中隔と一塊になった鼻粘膜と脳を取り出し、4% パラホルムアルデヒド、0.2% ピクリン酸を含む0.1M 磷酸緩衝液にて一晩後固定し、15% ショ糖加磷酸緩衝食塩水にて2日間浸透させた。嗅球は脳から切り放し、前額断方向に3つの部位(吻側部、中央部、尾側部)に分けた。吻側部1/3の嗅球はエポン包埋用のブロックとした。中央部1/3の嗅球と残りの脳はマイクロトームにて前額断方向の厚さ20 $\mu$ mの連続凍結切片を作成し以下の免疫組織化学的検討に用いた。鼻中隔と一塊になった鼻粘膜はエチレンジアミン4酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)にて脱灰、アルコール上昇系列にて脱水後パラフィン包埋し、マイクロトームにて前額断方向の厚さ3 $\mu$ mの切片を作成した。

### 2. 免疫組織化学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-複合法(avidin biotin peroxidase complex method, ABC法)にて行った。

#### 1) 嗅球、前脳

凍結切片は0.3% トライトンX加磷酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline with 0.3% Triton-X100, 0.3% PBST)に2日間つけた後、超音波を1分間かけた。0.3% 過酸化水素加磷酸緩衝食塩水にて10分間内因性ペルオキシダーゼの活性を阻止し、さらに非特異的反応を阻止するため5% 正常ヤギ血清を15分間反応させた後、一次抗体を室温で一晩反応させた。一次抗体として抗セロトニン抗体(1:5,000)(Eugene Tech, Ramsey, USA),

抗ドーパミンベータハイドロキシラーゼ(dopamine  $\beta$ -hydroxylase, DBH)抗体(1:5,000)(Eugene Tech), 抗タイロシンハイドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase, TH)抗体(1:5,000)(Eugene Tech)を使用した。二次抗体はビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体(1:200)(Vector, Burlingame, USA)を使用し室温で1時間反応させた。ついでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(DAKO, Glostrup, Denmark, 1:600)と1時間反応させた。発色はジアミノベンチジン(3,3'-diaminobenzidine)溶液にて7~15分間反応した。

また隣接切片は、クレシール紫(cresyl violet)にてニッスル染色を行った。

#### 2) 嗅上皮

パラフィン切片は脱パラフィンした後、0.3% 過酸化水素加メタノールにて10分間内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。0.3% PBSTに2時間つけた後、0.4% トリプシンにて10分間消化処理を加えた。非特異的反応を阻害するため5% 正常ヤギ血清を15分間反応させた。一次抗体は抗プロテインジーンプロダクト9.5(protein gene product 9.5, PGP9.5)抗体(1:2,000)(Ultraclone, Wallow, England)を一晩反応させた。二次抗体以降は上記と同じ操作をおこなった。嗅粘膜ではPGP9.5は嗅細胞と嗅神経線維で特異的に陽性となるので<sup>20,21)</sup>、嗅細胞の形態観察と同時に嗅上皮と呼吸上皮の鑑別の目的で使用した。

#### 3. トルイジンブルー染色

吻側部1/3の嗅球は2% オスミウム酸で後固定、エタノール系列で脱水後エポン包埋し、LKB 8800 Ultratome III(LKB, Stockholm, Sweden)にて1 $\mu$ mの切片を作成した。この際嗅球の免疫染色並びにニッスル染色標本との対比を容易にするため、嗅球中央部に近い部位の切片標本を作成した。トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡下で嗅球の形態を観察した。

## 成 績

### 1. 嗅球におけるセロトニン線維(図2)

#### 1. 対照群(図2a)

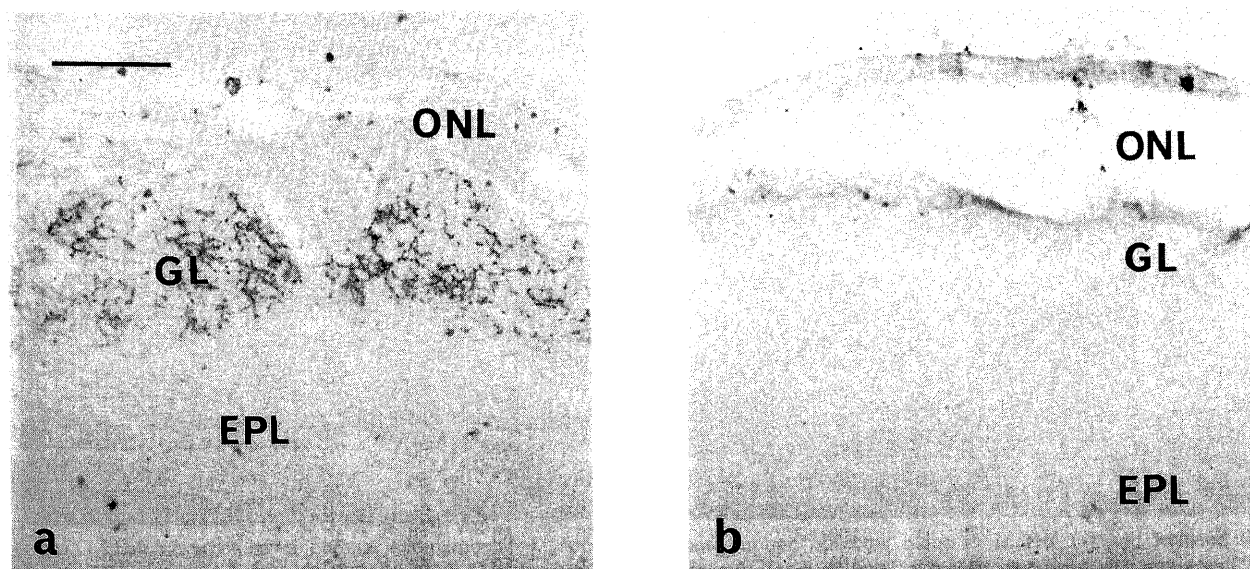


Fig. 2. Photomicrographs of coronal sections through olfactory bulbs showing serotonergic fibers in control case (a) and in neurotoxin injected case with anosmia (b). Note that serotonergic immunoreactivity in glomerular layer (GL) was absent in b. EPL, external plexiform layer; ONL, olfactory nerve layer. Bar in a indicates 100  $\mu$ m for a and b.

生理食塩水を内側前脳束に注入した対照群の嗅球では無数のバリコシティ (varicosities) で特徴づけられるセロトニン線維が糸球体層とりわけ糸球体に一致して密に分布していた。セロトニン線維は外叢状層、僧帽細胞層、顆粒細胞層には比較的少なくびまん性に認められた。

## 2. 5,7-DHT 注入群

5,7-DHT 注入群の嗅球では、セロトニン線維は全例において明かな減少を示したがセロトニン線維の障害の程度には差が認められた。そこで嗅球のセロトニンに対する免疫染色の結果に基づいて 5,7-DHT 注入群を以下の 2 群に分類した。

### 1) 完全障害群 (図 2b)

嗅球におけるセロトニン線維が全層ではほぼ完全に障害を受けており、本来セロトニン線維が密に分布する糸球体ではほとんど線維を認めなかったものを完全障害群とした。5,7-DHT 注入群 20 匹中 11 匹がこの完全障害群に属した。

### 2) 不完全障害群

嗅球におけるセロトニン線維は障害を受けていたが、セロトニン線維が糸球体に残存していたものを不完全障害群とした。5,7-DHT 注入群 20 匹中 9 匹がこの不完全障害群に属した。

## II. 嗅覚行動実験 (表 2, 3, 図 3)

前記の形態的分類に従って対照群, 完全障害群, 不完全障害群の 3 群にわけて嗅覚行動実験の結果をまとめた。3 群とも 5,7-DHT あるいは生理食塩水注入前にナラマイシンによる学習がなされており, 正解率 100% より開始した。対照群は 3 日, 7 日, 14 日, 21 日, 28 日のいずれの時期にも平均正解率は 97~99% と高く, 最も成績の悪いラットでも 10 回の試行で 8 回正解しており 1 クールの正解率が 80% 未満になることはなかった。

### 1. 完全障害群

平均正解率をみると, 3 日は 97%±5%, 7 日は 83%±22% と対照群と比較して有意の差を認めなかった。14 日は 76%±21%, 21 日は 59%±11%, 28 日は 52%±9% で対照群と有意の差を認め無嗅覚の状態となった。

平均正解率の推移から判断すると, 嗅覚機能は時間経過につれて徐々に低下する傾向がうかがわれるが (表 2, 図 3), 個々のラットについて正解率の推移をみると嗅覚障害はある一定の時期に顕著に出現し, 個々のラットによってその出現時期が異なっていた (表 3)。5,7-DHT によるセロトニン線維の障害が完全であるならば嗅覚障害が高頻度に発現することが明らかになった。

### 2. 不完全障害群

3 日, 7 日, 14 日, 21 日, 28 日のいずれの時期においても平均正解率は 90% 以上で対照群と比較して有意の差は認められなかった。

5,7-DHT によるセロトニン線維の障害が不完全であると, 少なくともナラマイシンによる行動実験で検出可能な嗅覚機能には影響を及ぼさないものと思われた。

## III. 形態的観察 (図 4-図 8)

嗅球と嗅上皮の形態的变化は対照群と完全障害群について比較検討した。

### 1. 嗅球

クレシール紫によるニッスル染色 (図 4) では完全障害群は対照群と較べ明らかに嗅球の大きさが縮小していた。嗅球の各層についてみてみると, 萎縮は嗅神経線維層と糸球体層に顕著で, その他顆粒細胞層にも様々な程度の萎縮が認められた。個々の糸球体は円形を保っていたが, 対照群の約 1/2 に縮小

Table 2. Correct responses of control, complete lesion and incomplete lesion groups

	Number of rats used	Preoperative trial	Correct responses (mean ± SD, %)				
			Postoperative time (days)				
			3	7	14	21	28
Control	10	100±0	97±7	97±7	99±3	98±4	98±4
Complete lesion	11	100±0	97±5	83±22	76±21*	59±11*	52±9*
Incomplete lesion	9	100±0	98±4	93±5	96±7	90±7	94±7

\*P<0.01 vs. control group by Scheffé's multiple comparison test.

Table 3. Correct responses of group with complete lesion

Case number	Preoperative trial	Correct responses (%)				
		Postoperative time (days)				
		3	7	14	21	28
1	100	90	80	90	60	60
2	100	100	90	100	50	40
3	100	100	100	100	80	50
4	100	90	90	100	60	70
5	100	100	50	80	50	50
6	100	100	100	50	50	50
7	100	100	100	50	50	40
8	100	90	50	50	60	50
9	100	100	50	60	60	50
10	100	100	100	70	80	50
11	100	100	100	90	50	60

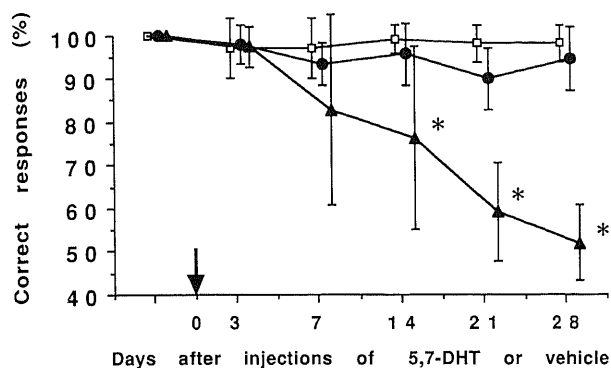


Fig. 3. Correct responses in three groups of controls (□-□, N=10), complete lesions (▲-▲, N=11), and incomplete lesions (●-●, N=9). Note that group with complete lesions show loss of ability of discrimination remarkably at 21-28 days after 5,7-DHT injections. Arrow indicates infusions of 5,7-DHT or vehicle. Statistically significant values are featured by asterisks ( $p < 0.01$ ).

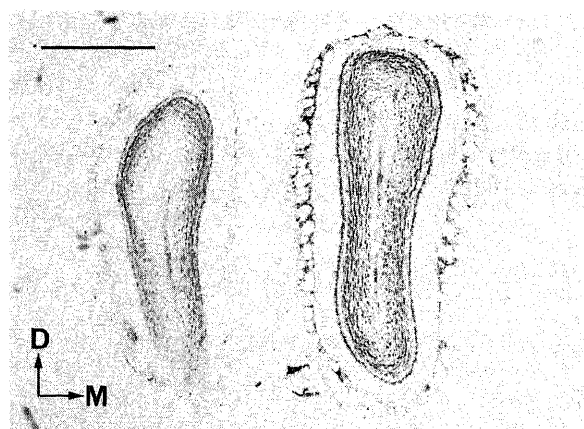


Fig. 4. Photomicrographs of coronal sections through olfactory bulbs in control (right) and lesioned (left) rats. Note reduced size of olfactory bulb in lesioned anosmic rat compared to size of olfactory bulb in control rat with normal olfaction. Dorsal (D) is up, medial (M) to the right. Nissl-stain. Bar indicates 1mm.

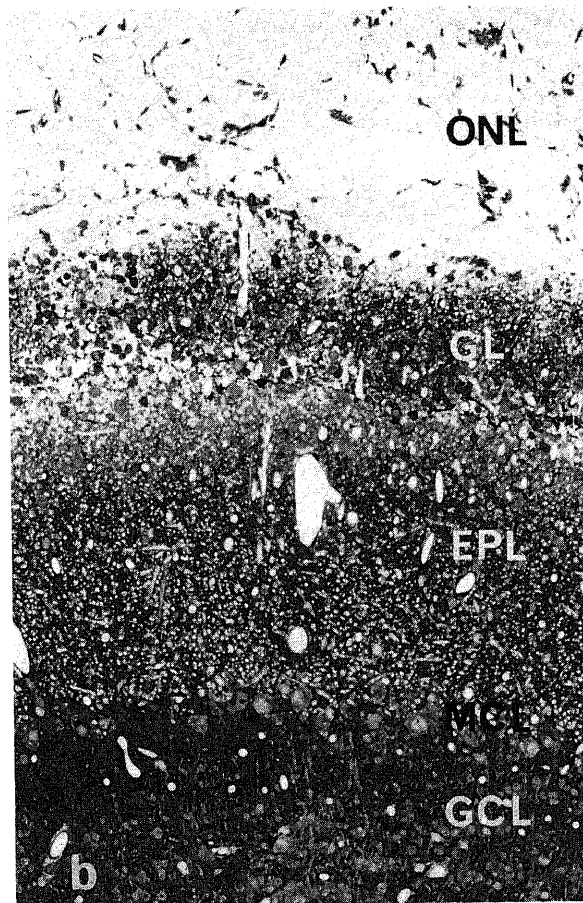
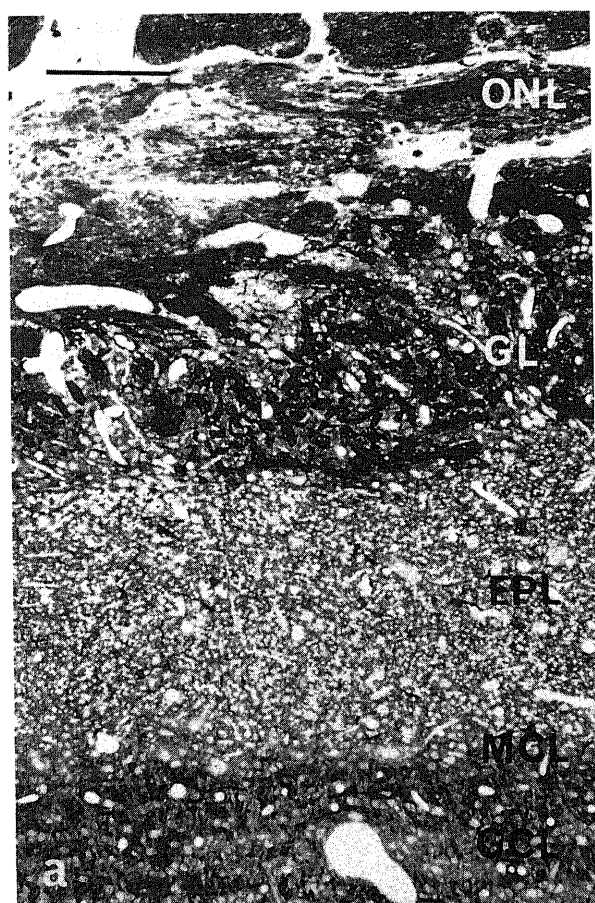


Fig. 5. Photomicrographs of coronal epon-embedded semithin sections through olfactory bulbs in control (a) and lesioned (b) rats. Note that normal bulbar structure with olfactory nerve, glomerular and external plexiform layers is well preserved in control rat, while disappearance of olfactory nerve bundles and shrinkage of glomeruli are apparent in lesioned anosmic rat. EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; GL, glomerular layer; MCL, mitral cell layer; ONL, olfactory nerve layer. Toluidine blue stain. Bar in a indicates 100  $\mu$ m for a and b.



していた。僧帽細胞層、外叢状層の萎縮はあまりはっきりしなかった。

トリイジンブルー染色 (図5) では嗅神経線維層と糸球体層の変化がより一層明瞭となった。嗅神経線維束はそのほとんどが変性消失し、嗅神経線維束をとりまくグリア細胞の残存がめだっていた。部分的に嗅神経線維束を認める所もあったが、全

体からみると極くわずかであった。嗅神経線維束の消失にともなって糸球体の形態も変化し、対照群の糸球体では嗅神経線維束から連続する暗調な斑点部と、僧帽細胞と房飾細胞の樹状突起からなる明調な斑点部の両者が認められるのに対して、完全障害群の糸球体は嗅神経線維束から連続する暗調な斑点部が消失し、僧帽細胞と房飾細胞の樹状突起からなる明調な斑点部の

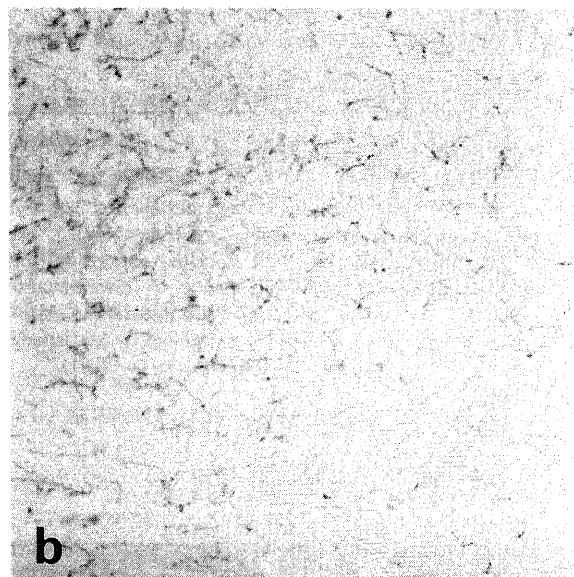
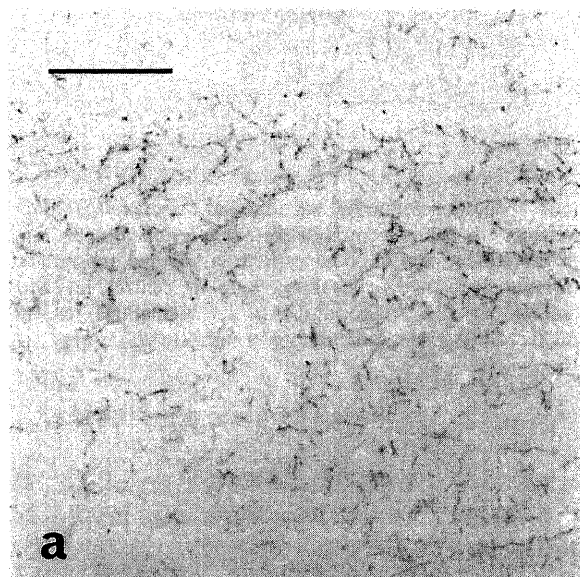


Fig. 6. Photomicrographs of coronal sections through olfactory bulbs, immunohistochemically stained for dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) in control (a) and lesioned (b) rats. No significant differences between control and lesioned bulbs can be seen in DBH-immunoreactive axons in granule cell layer. Bar in a indicates 100  $\mu$ m for a and b.

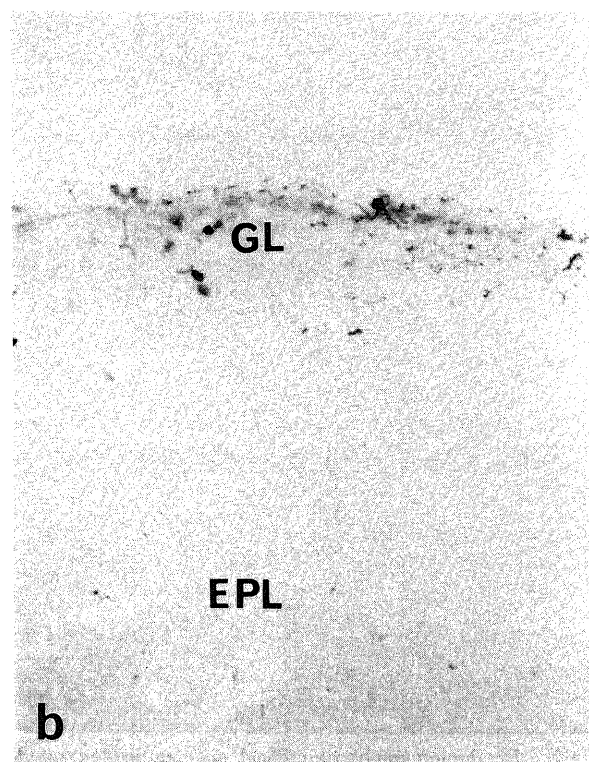
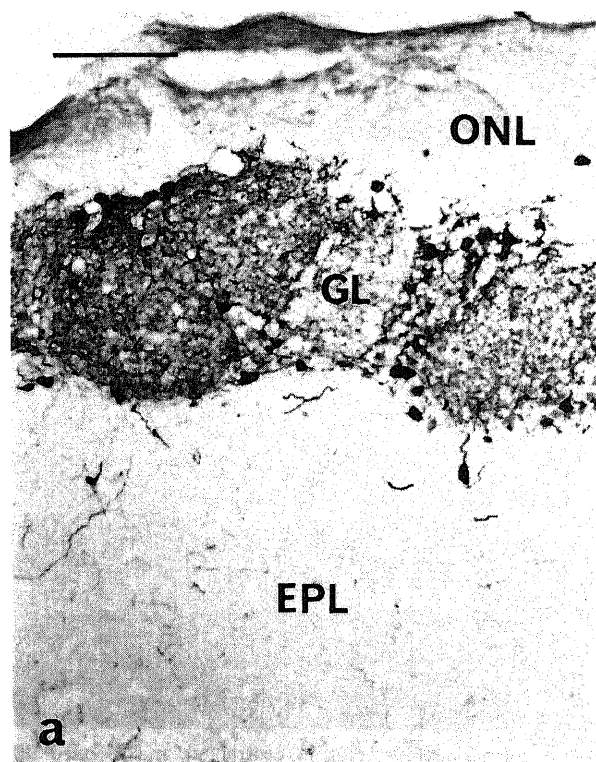


Fig. 7. Photomicrographs of coronal sections through olfactory bulbs, immunohistochemically stained for tyrosine hydroxylase (TH) in control (a) and lesioned (b) rats. Note numerous TH-immunoreactive neurons and axons in glomerular layer of control bulb. Neuronal elements with TH immunoreactivity of lesioned bulb show marked decrease in rat with long-term anosmia. EPL, external plexiform layer; GL, glomerular layer; ONL, olfactory nerve layer. Bar in a indicates 100  $\mu$ m for a and b.

みが残存していた。これらの変化に対して僧帽細胞、房飾細胞には明らかな変化は認められなかった。

免疫染色では(図6) DBH 陽性のノルアドレナリン線維は対照群に比べてやや減少している例も認められたが、他の多くの例においては明らかな差がみられず、5,7-DHT によるノルアドレナリン線維への影響は少ないものと考えられた。

糸球体層の TH 陽性細胞は DBH 陰性であることからドーパミン細胞であると考えられる(図7)。対照群では糸球体周囲の傍糸球体細胞が多数ドーパミン陽性で多量の線維が糸球体に分布していた。これに対して完全障害群では、ドーパミン細胞とその線維は有意に減少していた。減少の程度は各ラットにより、又同一ラットでも嗅球の部位により様々であったが、嗅覚障害の期間の短い動物では軽度で、長期間嗅覚障害が継続した動物では高度である傾向がみられた。

## 2. 嗅上皮

嗅上皮内の嗅細胞と嗅神経線維束を調べるため抗 PGP9.5 抗体を用いて免疫染色をおこなった。生理食塩水注入側の対照群

の嗅上皮では PGP9.5 陽性の嗅細胞が多数存在し、粘膜下には PGP9.5 陽性の嗅神経線維束が多数認められた(図8a)。これに対して、5,7-DHT 注入側の嗅上皮では PGP9.5 陽性の嗅細胞は減少又は完全に消失していた。このため嗅上皮は著明に薄くなっていた。粘膜下では、PGP9.5 陽性の嗅神経線維束には一般に免疫染色性の低下がみられ、線維束も細くまばらで、完全に消失している所も少なくなかった(図8b, c)。

## 考 察

中枢神経系におけるセロトニンニューロンの細胞体の分布については1964年 Dahlström らがラット脳で明らかにし、9群をわけている<sup>20)</sup>。セロトニンニューロンの細胞体は中脳、橋、延髄に存在し、その主体は縫線核群の中に存在する。セロトニンニューロンの投射路は大きく上行路と下行路に分かれるが、嗅球に投射する線維は縫線核群の背側縫線核と正中縫線核より出て、上行路の内側前脳束に入る。前脳の吻側、前嗅核のレベルでは前嗅核の腹側内方を通り嗅球に入る<sup>21)</sup>。嗅球では糸球体層

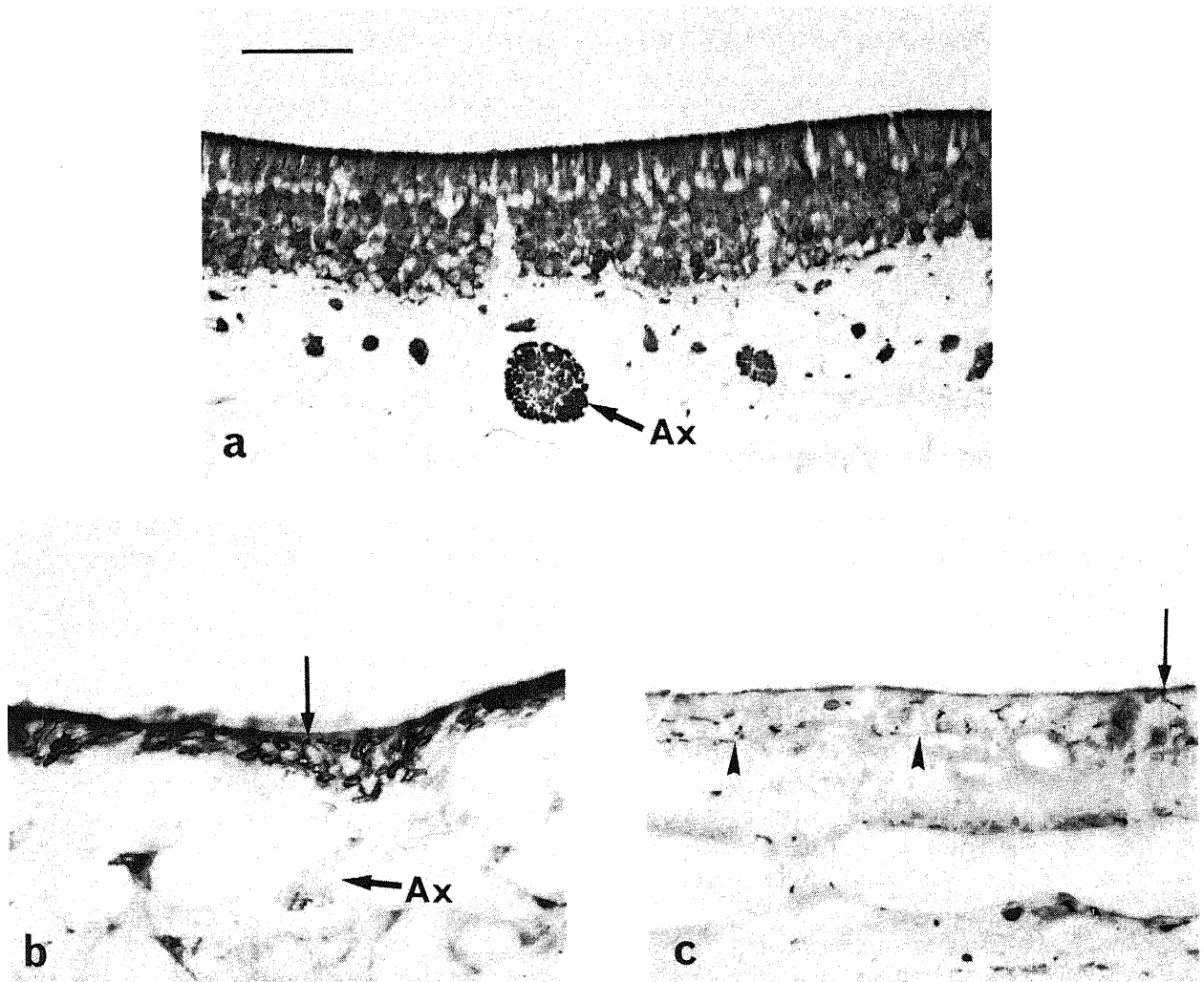


Fig. 8. Photomicrographs of coronal sections through olfactory epitheliums, immunohistochemically stained for protein gene product 9.5 (PGP9.5) in control (a) and lesioned (b and c) rats. Olfactory epithelium of control rat contains several layers of olfactory receptor cells with PGP9.5 immunoreactivity. Olfactory epitheliums of lesioned rats are atrophic with reduced or no olfactory receptor cells with PGP9.5 immunoreactivity. Ax, axonal bundles with PGP9.5 immunoreactivity. Note the difference in staining of immunoreactive axon bundles in a and b. Arrows in b and c indicate olfactory vesicles with PGP9.5 immunoreactivity. Arrowheads in c point to basal lamina of olfactory epithelium. Bar in a indicates 100  $\mu$ m for a, b and c.

とりわけ糸球体に強く分布し、糸球体層より深層の外叢状層、僧帽細胞層、顆粒細胞層には分布が弱い<sup>9)~11)</sup>。

神経毒により特定の神経を選択的に障害してその神経系の機能と構造を調べる研究は1967年、Tranzer らがノルアドレナリンの類似体である 6-ハイドロキシドーパミン (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) を報告したことに始まる<sup>24)25)</sup>。ついで1971年 Baumgarten がセロトニンの神経毒である 5,6-ジハイドロキシトリプタミン (5,6-dihydroxytryptamine, 5,6-DHT) と 5,7-DHT を報告した<sup>26)</sup>。モノアミンに作用するこれらの神経毒はいずれも血液脳関門を通過することができないので直接脳内や脳室内に投与する必要がある<sup>10)</sup>。今回の実験では 5,6-DHT よりも非特異的細胞障害性の弱い 5,7-DHT を嗅球への投射路である内側前脳束へ注入するという方法を用いた。5,7-DHT を内側前脳束へ注入する方法は 1) 細胞体よりも線維の方が感受性が高く障害をうけやすい<sup>10)</sup> 2) 嗅覚伝導路 (嗅上皮-嗅神経-嗅球-外側嗅索-嗅皮質) に機械的損傷を与えない、という点で優れており嗅球内セロトニン線維を選択的に枯渇可能にした点で、セロトニンの嗅覚機能への影響を調べる本実験には適していたものと思われる。さらに観察対象である嗅上皮、嗅球に直接的機械的損傷が加わっていないためこれらの部位の形態観察が可能であることは大きな利点である。

セロトニンの嗅覚に及ぼす影響について考察する前にここでナラマイシンによる嗅覚行動にふれておく。動物の嗅覚の行動実験は1950年代よりおこなわれてきたが<sup>27)28)</sup>、装置が複雑であったり条件反射を形成するのに手間がかかり広くは普及しなかった。Omura らは防鼠剤であるナラマイシンをもちいて嗅覚障害を確かめる簡便な方法を報告しており<sup>10)</sup>、今回はそれに準じて嗅覚行動実験をおこなった。ナラマイシンは放線菌の一種 *Streptomyces naraensis* が産生する抗生物質<sup>10)</sup>で、現在でも防鼠剤としてカーテンや電気製品のコードに含まれて使用されており、鼠がナラマイシンを忌避する機序は前述のごとくである。

本実験では前述した理由で一側の嗅球除去を全例のラットに施した。この嗅球除去を受けたラットは無処置のラットと同様に 3~4 クールでナラマイシンによる条件づけに成功した。このことは一側の嗅球除去処置はナラマイシンの学習には影響しないことを意味している。その理由として一側の嗅球のみで処理された嗅覚情報は皮質間結合を通して左右の嗅皮質に伝えられるという機構が重要な役割を果たしているものと思われる<sup>29)</sup>。ナラマイシンによる学習の効果がどれくらい維持するかも重要な点である。マウスではナラマイシンによる学習が長期間持続し、1 クールと 1 クールの間隔が 20 日間でも正解率が低下しないことが確かめられている<sup>10)</sup>。今回の行動観察は長くても 7 日間の間隔であり、学習の効果は十分持続しているものと思われる。実際に对照群の処置後の嗅覚行動実験の成績は日をおいても低下することなく平均正解率は 97% 以上を維持していた。

完全障害群の嗅覚行動実験について興味深い結果が得られた。平均正解率は処置後 14 日で对照群と有意差をもって低下し、嗅覚障害の出現を認めた。さらに 28 日には、正解率は全例のラットにおいて 50% (平均正解率 52%) 近くにまで低下し、無嗅覚の状態になった。手術後早期 (3 日) には嗅覚機能の低下が認められなかったことから 5,7-DHT による嗅覚障害は注入による嗅覚伝導路への直接の侵襲によるものでないことを示し

ている。完全障害群では高頻度に嗅覚障害が出現したのに対して、不完全障害群の嗅覚機能は对照群と比較して有意に低下していなかった。この事実はラットに嗅覚障害をおこさせるためには嗅球でのほぼ完全なセロトニンの低下が必須の条件であることを示している。5,7-DHT の効果は一般に量依存性の傾向を示すことが知られているが<sup>10)</sup>、今回の実験に使用した濃度 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  と 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ではその傾向が見られなかった。これまで報告されているように、前者の濃度でセロトニン線維に十分な損傷を与えることができると同時に<sup>10)</sup>、内側前脳束が脳底部近くに位置するという解剖学的特徴から考えてセロトニン線維の不完全な障害はむしろ 5,7-DHT が脳実質外に漏出した事がその原因ではないかと推定される。一側の嗅球除去処置はこの点でも有効であったと思われる。

セロトニン神経毒による嗅覚障害について最も興味深い点は神経毒注入後 14~28 日に嗅覚異常が出現することである。5,7-DHT を直接脳内又は脳室内に投与すると、注入後数時間でセロトニンの急激な低下がおこり、その後数日にわたってさらに徐々に低下がすすむことが知られている<sup>17)18)</sup>。著者もこの点を確認する目的で、5,7-DHT を今回の実験と同様に内側前脳束に注入して注入側の嗅球についてしらべた所、注入後 2 日および 3 日にはセロトニン線維がほぼ完全に消失しているのを確かめた。すなわちセロトニン神経毒によって嗅球でのセロトニンは投与後数日で既に枯渇しているにもかかわらず、嗅覚機能の低下は投与後数週間経過した後に出現する事実が確かめられた。このことからセロトニン神経毒によって誘発される嗅覚障害はニューロン間の迅速な神経伝達を調節する神経伝達物質としてのセロトニンの作用が損なわれたためにおこったのではなく、おそらくセロトニンの神経栄養因子としての機能が損なわれたためにおこったものであろうと推定された。このようなセロトニンの栄養因子としての機能については近年特に発達期の脳について神経系の発達、維持、可塑性等に重要な役割を果たしていることが次第に明らかになってきている。例えばセロトニンは神経発達の早期の段階において標的の神経芽細胞の細胞分裂を停止させニューロンへの分化を促進させる作用をもつことが知られている<sup>30)31)</sup>。またセロトニンは発達中の動物でも成熟動物でもシナプスの形成と維持に対して重要な役割をはたしている<sup>32)</sup>と Okada らは述べている<sup>32)</sup>。Haydon らはかたつむり (*Helisoma*) でセロトニンがニューロンの成長円錐の運動性とシナプス形成を抑制するという逆の働きも報告している<sup>33)</sup>。

今回の実験の完全障害群における嗅球、嗅上皮の形態的变化は嗅覚行動実験の結果と完全に一致しており、嗅覚障害を呈したラットの嗅球と嗅上皮には必ず形態的異常が観察された。嗅球の変化は主として嗅神経線維の変性消失であり、その結果嗅神経線維層と糸球体内の嗅神経線維が変性消失し、嗅球は著明に萎縮していた。本来セロトニン線維が密に分布している糸球体に病変の主体が認められるのは強調すべき重要な点である。嗅球の変化に一致して嗅上皮も著明に萎縮し、嗅細胞が全域にわたって減少又は消失していた。これらの嗅上皮と嗅球の変化が嗅覚障害の原因であることは言うまでもないことである。しかしセロトニン神経毒によって初期に障害を受ける部位が嗅球であるか又は嗅上皮であるかは重要な問題であるが、今回の実験からは判断できない。いずれにしても嗅球でセロトニンが長期間枯渇すると一次感覚ニューロン (嗅細胞) の嗅上皮内の細胞体もしくは嗅球糸球体内の軸索終末のいずれかに変性がおこ



ることは確かである。嗅神経線維以外の嗅球の萎縮は嗅神経線維の変性消失が先行し嗅刺激が減少したためにおこったものと思われる。前鼻孔をふさいで嗅刺激を遮断すると成熟動物でも1ヵ月後には嗅球の全層に萎縮がおこるという実験報告から説明できる現象である<sup>34)~36)</sup>。

嗅球にはセロトニンの他にノルアドレナリンやドーパミン等のモノアミンが豊富に存在する<sup>6)37)</sup>。セロトニン神経毒によって嗅覚異常をきたした完全障害群のラットの嗅球におけるこれらのモノアミン線維についてここで述べる。セロトニンと同じモノアミンニューロン系に属するノルアドレナリンニューロンは、脳幹に位置する青斑核を中心とする限局した部に細胞体が存在し、脳全域に広く線維を投射している。ラット嗅球におけるノルアドレナリン線維は主として外叢状層までにびまん性に分布し、糸球体にまで侵入する線維は少ない<sup>37)</sup>。5,7-DHT はセロトニンニューロンに対する選択性は高いがノルアドレナリンニューロンに対しても量に依り若干障害性を持つことが知られている<sup>18)</sup>。内側前脳束はラットでは、セロトニンの投射路であるばかりでなく同じく嗅球に投射するノルアドレナリン線維の投射路でもあるので、ノルアドレナリンの影響も考慮しておく必要があるが、成績において記載したように 5,7-DHT によるノルアドレナリン線維への障害は少なく対照群との明らかな差が認められなかった。嗅球のノルアドレナリンについては Keverne らが大変興味深い研究結果を発表している。彼らの研究によれば、嗅球のノルアドレナリンを低下させると雌マウスが性行動時の雄マウスの臭いを記憶する学習過程が障害を受ける。すなわち嗅球ノルアドレナリンは嗅覚機能それ自体には影響を及ぼさず、嗅覚学習に重要な役割を果たしているとして述べている<sup>38)39)</sup>。さらに嗅球のノルアドレナリン線維の低下によって雌の初産婦のマウスでは嗅覚や母性行動の障害は引き起こさないが出生直後の児を食べてしまうという報告や<sup>40)</sup>、ラットで同じく嗅球のノルアドレナリン線維を低下させると雄が雌の尿に対して反応する頻度が減少するという報告がある<sup>41)</sup>。

嗅球のドーパミン線維はセロトニン線維と同様に糸球体に豊富に存在するが、セロトニンやノルアドレナリンと異なりその細胞体は嗅球内に存在し糸球体層の傍糸球体細胞に属する<sup>42)43)</sup>。ドーパミンの嗅覚機能に関する役割は未だ不明である。嗅覚の消失した完全障害群のラットの嗅球ではドーパミン細胞とその線維は減少していた。そのためセロトニン神経毒によってまず糸球体でセロトニンが低下し、次にセロトニンの低下がドーパミンの低下を引き起こして嗅覚障害が発現した可能性も完全には否定できない。しかしながら嗅覚障害をきたした完全障害群の中にも、5,7-DHT 投与によって嗅球のセロトニンが完全に消失していたにもかかわらずドーパミン細胞とその線維がほぼ正常に保たれていた少数の例の存在はドーパミンの低下によって嗅覚障害が起こるものでないことを示している。前鼻孔をふさいで嗅刺激を遮断したり、硫酸亜鉛やトライトンXの鼻腔内注入によって嗅上皮に損傷を与えるとドーパミン陽性細胞が著明に減少するという事実が知られている。これらの研究によれば、嗅刺激の遮断はドーパミン細胞を変性させるのではなくドーパミン合成酵素の発現をおさえることが確かめられている<sup>44)~46)</sup>。今回の実験におけるドーパミン細胞とその線維の減少はこの嗅神経線維がドーパミンの発現を誘導するという機序によってよく説明できるものと思われる<sup>42)43)47)</sup>。

高齢者が嗅覚の低下を訴えることは臨床的によく経験すると

ころである。また Doty らは、アルツハイマー病やパーキンソン病における嗅覚の検知と認知の低下を報告している<sup>48)~52)</sup>。加齢、アルツハイマー病、パーキンソン病で脳のセロトニンやセロトニンレセプターが低下しているという報告があり<sup>50)51)53)54)</sup>、このことと嗅覚障害は関係があるのかもしれない。

## 結 論

ラットにおいてセロトニンの神経毒である 5,7-DHT を内側前脳束に注入して嗅球のセロトニン線維の障害を試みたところ以下の結果を得た。

1. 嗅球でのセロトニン線維の障害の程度に基づいて、セロトニン線維が全層ではほぼ完全に消失していた完全障害群と、セロトニン線維の障害が不十分で糸球体への分布が残っていた不完全障害群に分類した。

2. ナラマイシンを用いた嗅覚行動実験で、完全障害群では 5,7-DHT 注入後14日で嗅覚障害が出現し28日で無嗅覚の状態となった。

3. 完全障害群の嗅球は著明に縮小していた。嗅球の層構造のうち嗅神経線維層は消失、糸球体層と顆粒細胞層には萎縮が認められた。僧帽細胞層、外叢状層は比較的保たれていた。

4. 完全障害群の嗅上皮は著明に萎縮し、嗅細胞は減少又は完全に消失していた。

5. 完全障害群の嗅球におけるノルアドレナリン線維は明らかな減少を認めず、嗅覚機能に与えた影響は小さいと思われる。ドーパミン細胞は一般に減少していたが、ノルアドレナリン線維と同様に嗅覚機能には直接影響を与えないものと思われる。

以上の結果より嗅球セロトニン線維の障害は嗅覚障害を起こすとの結論を得た。脳内の特定の伝達物質の欠損によって嗅覚障害がおこるという報告はなく、嗅覚障害の一つの新しいメカニズムを提起できるものと思われる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師古川 俊教授ならびに、終始直接の御教示、御指導を頂きました金沢大学医学部解剖学第三講座森泉哲次助教授に深甚なる謝意を表します。また貴重な御助言を賜りました金沢大学医学部解剖学第三講座工藤 基教授、金沢大学耳鼻咽喉科学教室木村恭之博士、三輪高喜博士に深謝いたします。最後に本研究に御協力を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室ならびに金沢大学医学部解剖学第三講座の皆様に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費、金沢大学医学部老人医療基金によったことを付記する。

## 文 献

- 1) Twarog, B. M. & Page, I. H.: Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *J. Physiol.*, 175, 157-161 (1953).
- 2) Messing, R. B.: Behavioral effects of serotonin neurotoxins: An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 305, 480-496 (1978).
- 3) Takeuchi, Y., Kimura, H. & Sano, Y.: Immunohistochemical demonstration of serotonin nerve fibers in the olfactory bulb of the rat, cat and monkey. *Histochemistry*, 75, 461-471 (1982).
- 4) Ihara, N., Ueda, S., Kawata, M. & Sano, Y.:

Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing nerve fibers in the mammalian hippocampal formation. *Acta Anat.*, **132**, 335-346 (1988).

5) Kohler, C. & Steinbusch, H.: Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, **7**, 951-975 (1982).

6) McLean, J. H. & Shipley, M. T.: Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J. Neurosci.*, **7**, 3016-3028 (1987).

7) Mamounas, L. A., Mullen, C. A., O'hearn, E. & Molliver, M. E.: Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: Morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J. Comp. Neurol.*, **314**, 558-586 (1991).

8) Lidov, H. G. W. & Molliver, M. E.: An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.*, **8**, 389-430 (1982).

9) Steinbusch, H. W. M.: Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat: cell bodies and terminals. *Neuroscience*, **6**, 557-618 (1981).

10) Greer, C. A.: *Smell and Taste in Health and Disease*, 1st ed., p65-81, Raven Press, New York, 1991.

11) Baumgarten, R., Bloom, F. E., Oliver, A. P. & Salmoiraghi, G. C.: Response of individual olfactory nerve cells to microelectrophoretically administered chemical substances. *Pfluegers Arch. Physiol.*, **277**, 125-140 (1963).

12) Bloom, F. E., Costa, E. & Salmoiraghi, G. C.: Analysis of individual rabbit olfactory bulb neuron responses to the microelectrophoresis of acetylcholine, norepinephrine and serotonin synergists and antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **146**, 16-23 (1964).

13) Omura, K. & Takagi, S. F.: On the mechanism of the repellent action of Naramycin to rats. *Gunma J. Med. Sci.*, **10**, 217-227 (1961).

14) 木村恭之, 上出文博, 宮崎為夫, 梅田良三: マウスの嗅刺激性行動に関する研究. 防鼠剤ナラマイシンを使用して. 耳鼻臨床, **80**, 469-475 (1987).

15) 三輪高喜: マウス嗅糸切断後の行動学的ならびに組織学的変化に関する研究. 十全医会誌, **98**, 391-414 (1989).

16) Kimura, Y., Miwa, T., Furukawa, M. & Umeda, R.: Effects of topical application of steroids on olfactory disturbance in mice. *Chem. Senses*, **16**, 297-302 (1991).

17) Björklund, A., Nobin, A. & Stenevi, U.: The use of neurotoxic dihydroxytryptamines as tools for morphological studies and localized lesioning of central indolamine neurons. *Z. Zellforsch.*, **145**, 479-501 (1973).

18) Jonsson, G.: Chemical lesioning techniques: Monoamine neurotoxins. In A. Björklund & T. Hökfelt (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Volume 1, Methods in

Chemical Neuroanatomy, 1st ed., p463-507, Elsevier, Amsterdam, 1983.

19) Lorden, J. F., Oltmans, G. A., Dawson, Jr. R. & Callahan, M.: Evaluation of the non-specific effects of catecholamine and serotonin neurotoxins by injection into the medial forebrain bundle of the rat. *Pharmac. Biochem. Behav.*, **10**, 79-86 (1978).

20) Taniguchi, K., Saito, H., Okamura, M. & Ogawa, K.: Immunohistochemical demonstration of protein gene product 9.5 (PGP9.5) in the primary olfactory system of the rat. *Neurosci. Lett.*, **156**, 24-26 (1993).

21) Iwanaga, T., Han, H., Kanazawa, H. & Fujita, T.: Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 (PGP9.5) in sensory paraneurons of the rat. *Biomed. Res.*, **13**, 225-230 (1992).

22) Dahlström, A. & Fuxe, K.: Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.*, **62** (Suppl.), 1-55 (1964).

23) McLean, J. H. & Shipley, M. T.: Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: II. Changes in fiber distribution during development. *J. Neurosci.*, **7**, 3029-3039 (1987).

24) Tranzer, J. P. & Thoenen, H.: Ultramorphologische Veränderungen der sympathischen Nervenendigungen der Katze nach Vorbehandlung mit 5- und 6-Hydroxy-Dopamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Path.*, **257**, 343-344 (1967).

25) Thoenen, H. & Tranzer, J. P.: Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Path.*, **261**, 271-288 (1968).

26) Baumgarten, H. G., Björklund, A., Lachenmayer, L., Nobin, A. & Stenevi, U.: Long-lasting selective depletion of brain serotonin by 5,6-dihydroxytryptamine. *Acta Physiol. Scand.*, **373** (Suppl.), 1-15 (1971).

27) Pfaffman, C.: An olfactometer for the rat. *Science*, **128**, 1007-1008 (1958).

28) Michelson, W. J.: Procedure for studying olfactory discrimination in pigeons. *Science*, **130**, 630-631 (1959).

29) Leon, M.: Plasticity of olfactory output circuits related to early olfactory learning. *Trends Neurosci.*, **10**, 434-438 (1987).

30) Lauder, J. M. & Krebs, H.: Serotonin as differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.*, **1**, 15-30 (1978).

31) Lauder, J. M.: Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **600**, 297-313 (1990).

32) Okado, N., Cheng, L., Tanatsugu, Y., Hamada, S. & Hamaguchi, K.: Synaptic loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J. Neurobiol.*, **24**, 687-698 (1993).

- 33) Haydon, P. G., McCobb, D. P. & Kater, S. B.: Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science*, **226**, 561-564 (1984).
- 34) Maruniak, J. A., Taylor, J. A., Henegar, J. R. & Williams, M. B.: Unilateral naris closure in adult mice: atrophy of the deprived-side olfactory bulbs. *Dev. Brain Res.*, **47**, 27-33 (1989).
- 35) Meisami, E.: Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of unilateral anosmia. *Brain Res.*, **107**, 437-444 (1976).
- 36) Benson, T. E., Ryugo, D. K. & Hinds, J. W.: Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: A light and electron microscopic, morphometric analysis. *J. Neurosci.*, **4**, 638-653 (1984).
- 37) Shipley, M. T., Halloran, F. J. & de la Torre, J.: Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.*, **329**, 294-299 (1985).
- 38) Keverne, E. B. & de la Riva, C.: Pheromones in mice: reciprocal interaction between the nose and brain. *Nature*, **296**, 148-150 (1982).
- 39) Brennan, P., Kaba, H. & Keverne, E. B.: Olfactory recognition: a simple memory system. *Science*, **250**, 1223-1226 (1990).
- 40) Calamandrei, G., Wilkinson, L. S. & Keverne, E. B.: Olfactory recognition of infants in laboratory mice: role of noradrenergic mechanisms. *Physiol. Behav.*, **52**, 901-907 (1992).
- 41) Guan, X., Blank, J. L. & Dluzen, D. E.: Role of olfactory bulb norepinephrine in the identification and recognition of chemical cues. *Physiol. Behav.*, **53**, 437-441 (1993).
- 42) Baker, H., Kawano, T., Margolis, F. L. & Joh, T. H.: Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.*, **3**, 69-78 (1983).
- 43) Baker, H., Kawano, T., Albert, V., Joh, T. H., Reis, D. J. & Margolis, F. L.: Olfactory bulb dopamine neurons survive deafferentation-induced loss of tyrosine hydroxylase. *Neuroscience*, **11**, 605-615 (1984).
- 44) Brunjes, P. C., Smith-Crafts, L. & McCarty, R.: Unilateral odor deprivation: Effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Dev. Brain Res.*, **22**, 1-6 (1985).
- 45) Brunjes, P. C.: Unilateral odor deprivation: Time course of changes in laminar volume. *Brain Res. Bull.*, **14**, 233-237 (1985).
- 46) Nadi, N. S., Head, R., Grillo, M., Hempstead, J., Grannot-Reisfeld, N. & Margolis, F. L.: Chemical deafferentation of the olfactory bulb: Plasticity of the levels of tyrosine hydroxylase, dopamine and norepinephrine. *Brain Res.*, **213**, 365-377 (1981).
- 47) Kawano, T. & Margolis, F. L.: Transsynaptic regulation of olfactory bulb catecholamines in mice and rats. *J. Neurochem.*, **39**, 342-348 (1982).
- 48) Hornykiewicz, O. & Kish, S. J.: Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. In M. D. Yahr & K. J. Bregmann (eds.), *Advances in Neurology*, Volume 45, Parkinson's Disease, 1st ed., p19-34, Raven Press, New York, 1986.
- 49) Whitford, G. M.: Alzheimer's disease and serotonin: a review. *Neuropsychobiology*, **15**, 133-142 (1986).
- 50) Cross, A. J.: Serotonin in Alzheimer-type dementia and other dementing illnesses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **600**, 405-417 (1990).
- 51) Middlemiss, D. N., Palmer, A. M., Edel, N. & Bowen, D. M.: Binding of the novel serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in normal and Alzheimer brain. *J. Neurochem.*, **46**, 993-996 (1986).
- 52) Doty, A. L.: *Smell and Taste in Health and Disease*, 1st ed., p735-751, Raven Press, New York, 1991.
- 53) Steinbusch, H. W. M., Van Luijckelaar, M. G. P. A., Dijkstra, H., Nijssen, A. & Tonnaer, J. A. D. M.: Aging and regenerative capacity of the rat serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **600**, 384-403 (1990).
- 54) Azmitia, E. C. & Whitaker-Azmitia, P. M.: Awakening the sleeping giant: Anatomy and plasticity of the brain serotonergic system. *J. Clin. Psychiatry*, **52**, 4-16 (1991).

**Effects of Serotonin on Olfaction** Toshiaki Tsukatani, Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **103**, 231—242 (1994)

**Key words** serotonin, 5, 7-dihydroxytryptamine, olfactory disturbance, olfactory bulb, olfactory epithelium

#### Abstract

The functional role of serotonin in olfaction was studied in the rat. All rats received unilateral removal of the olfactory bulb. They were initially trained to discriminate cycloheximide (Naramycin) solution from water by olfaction, and finally acquired 100% correct responses to avoid Naramycin solution. To deplete serotonin in the olfactory bulb on the intact side, these conditioned animals received injections of 5, 7-dihydroxytryptamine (5, 7-DHT), a specific neurotoxin for serotonin, into the medial forebrain bundle contralaterally to the bullectomy. Then the olfactory function was tested by the ability to discriminate Naramycin solution from water 3, 7, 14, 21 and 28 days after 5, 7-DHT injections. After completing the behavior task, all the rats were perfused with a fixative, and specimens including the olfactory epitheliums, the olfactory bulbs and the adjacent forebrains were taken for morphological analyses. Immunohistochemistry for serotonin, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, tyrosine hydroxylase and protein gene product 9.5 was done to evaluate the degree of serotonin depletion, the specificity of 5, 7-DHT for monoamines and the visualization of olfactory receptor cells. Based on the degree of serotonin depletion particularly at the bulbar glomeruli, the lesioned rats were divided into one group with complete lesions and another group with incomplete lesions. The group with complete lesions showed anosmia progressively at 21-28 days after 5, 7-DHT injections. Histological examination revealed severe atrophy of the olfactory bulb with disappearance of the olfactory nerve bundles and shrinkage of the glomeruli. Olfactory receptor cells, which had been stained with the antibody to protein gene product 9.5, were reduced or lost in parallel with the marked atrophy of the olfactory epithelium. No significant differences were found between the control and incompletely lesioned groups in the olfactory ability as well as the morphology. The results indicate that total depletion of serotonin in the olfactory bulb induces olfactory disturbance. This may provide a basis to understanding the centrally regulated mechanism of olfaction by a specific neurotransmitter.